

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 novembre 2001 (15.11.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/86291 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/50, C12Q 1/68, C12N 7/02

Manuel [IT/FR]; 49, rue Félix Faure, F-91270 Vi-
gneux-sur-Seine (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/01366

(74) Mandataire : CABINET ORES; 6, avenue de Messine,
F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 4 mai 2001 (04.05.2001)

(81) États désignés (*national*) : JP, US.

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (*régional*) : brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, TR).

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/05852 9 mai 2000 (09.05.2000) FR

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : NAU-
TILUS BIOTECH [FR/FR]; 4, rue Pierre Fontaine,
F-91000 Evry (FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (*pour US seulement*) : VEGA,

WO 01/86291 A1

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING BIOLOGICAL AGENTS IN LIVING TARGET CELLS

(54) Titre : PROCEDE DE DETERMINATION D'AGENTS BIOLOGIQUES DANS DES CELLULES CIBLES VIVANTES

(57) Abstract: The invention concerns a method for determining titre (concentration) of biological agents, such as gene transfer viral vectors, in real time, in living target cells and its uses in the field of gene therapy and diagnosis.

(57) Abrégé : Procédé de détermination du titre (concentration) d'agents biologiques, tels que des vecteurs viraux de transfert de gènes, en temps réel, dans des cellules cibles vivantes et ses applications dans le domaine de la thérapie génique et du diagnostic.

PROCEDE DE DETERMINATION D'AGENTS BIOLOGIQUES DANS DES CELLULES CIBLES VIVANTES

L'invention est relative à un procédé de détermination du titre
5 (concentration) d'agents biologiques, tels que des vecteurs viraux de transfert de gènes, en temps réel, dans des cellules cibles vivantes, ainsi qu'à ses applications (thérapie génique, génomique fonctionnelle, diagnostic viral, vaccins, protéines recombinantes).

Les progrès relatifs aux transferts de gènes en thérapie génique
10 dépendent d'une part de la capacité à développer et à produire des vecteurs permettant, dans la cellule cible, une expression régulée d'une protéine ou d'un ARN qui possèdent des effets thérapeutiques et d'autre part de la capacité à identifier de nouveaux gènes thérapeutiques.

Ainsi, avec le développement récent du domaine de la génomique
15 fonctionnelle, les vecteurs initialement développés pour le transfert de gènes, sont aussi utilisés comme outils pour le criblage des banques de gènes.

Ces progrès impliquent :

- la construction et le criblage de banques de vecteurs de transfert de gènes,
- 20 - le développement de constructions de vecteurs optimisées et parfaitement adaptées à chaque application thérapeutique, notamment en terme de ciblage tissulaire et de régulation de l'expression et
- la production en grande quantité de vecteurs contrôlés, standardisés et de qualité optimale, permettant de réaliser des études précliniques et des essais
25 cliniques de phase I.

Dans ce contexte, afin d'analyser rapidement de nombreuses constructions de vecteurs et d'optimiser leur production en grande quantité, il est important de pouvoir déterminer facilement, rapidement et précisément la concentration desdits vecteurs par des méthodes performantes.

30 Les méthodes de détermination de la concentration ou du titre desdits vecteurs, en particulier des vecteurs viraux, décrites dans la littérature se divisent en méthodes physiques et en méthodes biologiques.

Les méthodes physiques mesurent le titre en particules physiques (*pp*) (Mittereder et al., J. Virol., 1996, 70, 11, 7498-7509 ; Atkinson et al., NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823 ; Nelson et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 16, 2401-2405), qui représente le nombre total de particules virales de vecteur ; habituellement ce titre
5 est évalué soit directement par comptage des particules virales en microscopie électronique, soit indirectement par mesure du contenu en acides nucléiques (hybridation ou absorbance des acides nucléiques (DO_{260}) pour AAV et AdV, respectivement), ou en protéines virales (activité RT et contenu en p24, par exemple pour MLV et HIV, respectivement) des vecteurs. La mesure du titre en particules physiques ne reflète pas
10 la quantité de particules infectieuses présentes et biologiquement actives, en raison de la présence de particules défectives (*defective-interfering particles* ou *DI*) non infectieuses, sans génome ou avec un génome incomplet.

Les méthodes biologiques permettent, en revanche, de déterminer un titre en particules infectieuses (*ip* : unités infectieuses, unités formant plaque, unités de
15 transduction) (Mittereder et al., précité ; Salvetti et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 5, 695-706 ; Atkinson et al., NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823) par la mesure d'un paramètre biologique qui reflète l'activité du vecteur dans des cellules infectées en culture : réplication virale (AAV), intégration du provirus (rétrovirus, HIV), lyse
cellulaire (formation de foyers ou de plages de lyse, uniquement dans le cas de virus
20 lytiques (AdV, HSV)) et expression du transgène (tous les types de vecteurs). *ip* mesure le nombre de particules actives dans le processus biologique dont l'effet est mesuré. Ainsi, les préparations de vecteur présentant un titre élevé en particules infectieuses et un rapport particules physiques/particules infectieuses faible sont considérées comme étant de haute qualité, ces deux paramètres étant considérés
25 comme fournissant une information quantitative concernant la performance d'une préparation d'un vecteur de transfert de gène.

Quelle que soit la nature du paramètre mesuré, les méthodes décrites reposent essentiellement sur une dilution en série du vecteur (environ 10 à 20 dilutions en double ou en triple), suivie d'une période d'incubation du vecteur avec les cellules
30 (1 à 15 jours), puis du traitement des cellules (lyse, fixation, coloration, addition de substrat, hybridation, PCR), de la mesure du paramètre fonctionnel et enfin de la détermination du titre qui correspond à la dilution limite, c'est-à-dire à la dilution la

plus élevée pour laquelle la valeur du paramètre biologique mesuré atteint sa limite de détection.

Le titre est généralement déterminé à partir de la courbe qui représente les valeurs du paramètre biologique en fonction de la dilution du vecteur :

- 5 - par une extrapolation linéaire à partir de la région centrale quasi-linéaire de la courbe suivie de la détermination de l'intersection avec l'axe des abscisses ou
- par une approximation asymptotique de ladite courbe dans la région des dilutions élevées ; une telle approximation peut être effectuée à l'aide d'un
- 10 programme informatique, qui repose sur une fonction hyperbolique pour le calcul du titre.

Ainsi, plus le nombre de dilutions testées est élevé, plus la valeur du titre sera précise.

- Cependant ces techniques sont peu fiables et présentent
- 15 l'inconvénient de ne pas être standardisées. Pour résoudre ce problème, de nouvelles méthodes mieux adaptées à la détermination du titre (ou concentration) et à la comparaison de différents virus recombinants utilisés en thérapie génique ont été proposées (E.M. Atkinson et al, précité ; Demande Internationale PCT WO 99/11764). Par exemple, dans l'article au nom d'E.M. Atkinson et al., précité et dans la Demande
 - 20 Internationale PCT WO 99/11764, la méthode qui est décrite met en œuvre essentiellement une étape d'amplification du matériel génétique viral dans une lignée cellulaire hôte, des préparations de vecteur standard de titre connu obtenues par dilutions en série et un contrôle interne de titre connu. De manière plus précise, la méthode comprend dans différents puits d'une plaque de microtitration, l'infection de
 - 25 cellules à l'aide de dilutions en série d'une préparation virale (10 dilutions en triplicat), la réplication du génome viral dans ladite cellule hôte pendant 48 h à 72 h, la lyse chimique de ladite cellule, une hybridation de l'acide nucléique, la mesure de la quantité relative d'acide nucléique viral répliqué dans chaque puits et la détermination du titre par extrapolation linéaire de la courbe, qui représente les valeurs des mesures
 - 30 obtenues en fonction de la dilution du vecteur.

Ainsi, les méthodes de l'Art antérieur, même les mieux adaptées comme celles décrites par d'E.M. Atkinson et al., précité, ne répondent pas aux

besoins du développement et de la production des vecteurs de transfert de gènes pour les raisons suivantes :

- elles sont très lourdes à mettre en œuvre et comprennent de nombreuses manipulations, à chaque étape de la méthode, en raison du nombre important d'échantillons correspondant à chaque dilution de vecteur. Par conséquent, elles ne sont pas utilisables dans le contexte du développement et de la production des vecteurs de transfert de gènes, qui implique le traitement de très nombreux échantillons pour comparer différentes constructions ou conditions de production des vecteurs ou bien pour suivre la cinétique de production de ces vecteurs,
- elles ne sont pas standardisées pour la plupart,
- elles sont difficilement automatisables, étant donné le nombre et la complexité des étapes à mettre en œuvre, et
- le résultat est obtenu à un temps fixe qui, en fonction de la nature du paramètre mesuré, est de plusieurs jours (expression d'un transgène) à plusieurs semaines (formation de plages de lyse). Ainsi, les délais nécessaires pour la mise en œuvre de ces méthodes ne sont pas adaptés à la détermination rapide de la concentration des vecteurs de transfert de gènes vecteurs, dans le criblage des banques de vecteurs, le contrôle en cours de production ou bien pour suivre la cinétique de production de ces vecteurs.

La présente invention s'est en conséquence donnée pour but, de fournir un procédé de détermination du titre d'un agent biologique qui répond mieux au besoin de la pratique, en ce qu'elle permet l'analyse de nombreux échantillons en temps réel.

L'invention a également pour objet les applications dudit procédé pour le criblage, l'analyse et la production des vecteurs viraux de transfert de gènes, des vaccins viraux et des protéines recombinantes ainsi que pour le diagnostic des infections virales.

La présente invention a pour objet un procédé de détermination du titre d'un agent biologique interagissant avec des cellules cibles vivantes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

(a₁) l'incubation dudit agent biologique à une concentration C initiale inconnue, avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,

(b₁) la mesure à différents temps successifs t , de l'intensité i d'un même signal, qui résulte de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes,

(c₁) la détermination du temps t_β correspondant à la valeur $i = \beta$, choisie dans l'intervalle $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$, tel que β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement, les concentrations minimales et maximales d'un agent biologique de référence, dont la courbe $t_\beta = f(C)$ (courbe de référence), est préétablie et

(d₁) la détermination de la concentration C initiale de l'agent biologique, à l'aide de ladite courbe de référence $t_\beta = f(C)$.

10

Définitions

- on entend par agent biologique : un vecteur de transfert de gènes viral ou non-viral, un virus, un anticorps, un vaccin ou une protéine recombinante.
- on entend par cellules cibles vivantes, des cellules cibles, *in vitro* ou *ex vivo*, avant leur modification par un agent biologique.
- on entend par titre C d'un agent biologique, sa concentration en particules (virus, vecteur de transfert de gène viral, vaccin viral) ou en molécules actives (protéine recombinante, anticorps), dans la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes (C correspond au titre en particules infectieuses ou *ip*, tel que défini ci-dessus pour les vecteurs viraux de transfert de gènes).
- on entend par réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, la réponse des cellules cibles à l'agent biologique ou processus biologique, il s'agit notamment :
 - de l'expression d'un gène rapporteur ou d'un transgène,
 - de la réplication, de l'intégration ou de l'activité cytolytique d'un virus,
 - d'une activité enzymatique, anti-virale, oncogénique, suppresseur de tumeur ou cytotoxique,
 - de la prolifération ou de la différenciation cellulaire, ou
 - de la liaison à des anticorps ou à des récepteurs.
- Le produit P de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes est mesurable par un signal ; il est déterminé par la mesure d'un paramètre

30

qui reflète la réponse des cellules cibles vivantes à l'agent biologique. De manière non limitative, on peut citer comme mesure : la quantité de protéine ou d'enzyme exprimée par un gène rapporteur ou un transgène, le nombre de copies de génome du vecteur viral, le nombre de cellules.

5 • on entend par signal, par exemple la fluorescence, la luminescence, l'absorbance ou le dénombrement de cellules. De manière non limitative, on peut citer comme technique de mesure du signal : la microscopie optique ou de fluorescence, la fluorimétrie, la luminométrie et la spectrométrie.

 • on entend par mesure de l'intensité du signal, la mesure du
10 produit P de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, sans intervention sur les cellules cibles et sur ladite réaction, dont le produit P est mesuré.

 • on entend par agent biologique de référence, un agent biologique identique ou similaire à l'agent biologique à analyser, qui présente des modifications qui n'affectent pas son activité dans la réaction dont le produit P est mesuré.

15 • on entend par mesure en temps réel, une mesure dont la valeur est obtenue instantanément.

De manière surprenante, l'Inventeur a montré que l'intensité du signal i , qui reflète la réponse des cellules cibles à l'agent biologique, dépend uniquement de deux paramètres : la concentration C et le temps t . Ainsi, lorsque t augmente,
20 l'intensité du signal i augmente, proportionnellement à la valeur de C ; en conséquence, pour une valeur de C constante, i varie proportionnellement à t et pour une valeur de t constante, i varie proportionnellement à C .

Alors que pour mesurer la concentration C d'un agent biologique, les méthodes de l'Art antérieur utilisent une valeur de t constante, l'Inventeur a
25 trouvé, de manière inattendue que l'utilisation d'une valeur constante de C permet une détermination plus simple, plus rapide et plus précise de la concentration des agents biologiques.

Ainsi, l'Inventeur a montré, de manière surprenante, que la concentration d'un échantillon biologique peut-être déterminée directement, sans avoir
30 besoin de diluer ledit échantillon, (1) en mesurant les valeurs de i à différents instants t et en déterminant la valeur t_β correspondant à la valeur $i = \beta$ puis (2) en déterminant la

valeur de C correspondant à la valeur t_β , à partir de la courbe de référence $t = f(C)$, telle que définie ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, la courbe de référence est établie simultanément ou préalablement à l'étape (a₁), telle
5 que décrite ci-dessus, selon les étapes suivantes :

(a₀) la préparation, de n dilutions en série d'un agent biologique de référence de concentration C_0 initiale connue, correspondant respectivement aux concentrations finales C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique,

(b₀) l'incubation de chaque dilution dudit agent biologique de référence obtenue en (a₀) avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,
10

(c₀) la détermination à différents temps successifs t_1 à t_n de l'intensité du signal i qui résulte de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, pour chaque concentration C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique de référence,

(d₀) le tracé de la courbe $i = f(t)$ pour chaque valeur C_1, C_2, \dots, C_n ,
15

(e₀) la détermination de la valeur β de i , telle que $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$ et β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement C_n et C_1 ,

(f₀) le tracé de la courbe de référence $t_\beta = f(C)$ pour la valeur $i = \beta$.

20 Le procédé de l'invention est parfaitement adapté à l'analyse de nombreux échantillons en temps réel, car il présente les avantages suivants :

- il est simple,
- il est rapide,
- il est précis,
- 25 - il est standardisé et
- il est automatisable.

En effet, le procédé de l'invention ne nécessite pas la dilution des échantillons ; par conséquent, il est particulièrement adapté à l'analyse de nombreux échantillons comme une banque de vecteurs de transfert de gènes. Par exemple, alors
30 que pour déterminer le titre de 30 échantillons de vecteurs, les techniques de l'art antérieur nécessitent, la réalisation de 10 à 20 dilutions et donc la manipulation de 300 à 600 échantillons de cellules à chaque étape de la technique (infection, lyse, fixation,

coloration, addition de substrat, hybridation), ce qui implique 1800 à 2400 manipulations pour une technique comprenant 3 étapes (infection, lyse ou fixation et coloration ou addition de substrat), le procédé de l'invention ne nécessite pas de dilution de l'échantillon, ni de manipulation des cellules et implique simplement 30 mesures du signal i . Par conséquent, contrairement, aux techniques de l'art antérieur, le procédé de l'invention est simple, parfaitement standardisé et automatisable.

Le procédé de l'invention est plus précis que les techniques de l'art antérieur, car dans ledit procédé les mesures sont effectuées à partir d'un même échantillon, pris à différents instants t , alors que dans les techniques de l'art antérieur les différentes dilutions de l'échantillon sont testées de façon indépendante, ce qui introduit des variations internes entre ces différentes dilutions.

Le procédé de l'invention qui utilise le temps comme paramètre variable, contrairement aux techniques de l'art antérieur, qui utilisent la concentration C comme paramètre variable, permet de déterminer la concentration des agents biologiques en temps réel en mesurant le signal i par des techniques comme la fluorimétrie, la luminométrie ou la spectrométrie, ce qui présente de nombreux avantages.

En effet, dans le procédé de l'invention, les valeurs expérimentales sont disponibles immédiatement ce qui permet d'avoir une estimation rapide de la concentration des vecteurs pour suivre la cinétique de production de ces vecteurs ou bien pour analyser rapidement une banque de vecteurs de transfert de gènes. En revanche, les techniques de l'art antérieur ne permettent pas de telles estimations étant donné qu'aucun résultat intermédiaire, en cours de test n'est disponible ; seul le résultat final est disponible, une fois que l'ensemble des données correspondant aux différentes dilutions ont été obtenues à l'instant t puis analysées, ce qui correspond à un délai de plusieurs jours à plusieurs semaines, en fonction de la technique utilisée.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit signal est sélectionné dans le groupe constitué par la fluorescence, la luminescence, l'absorbance ou le dénombrement de cellules.

De manière non-limitative, le signal est avantageusement mesuré par une technique telle que : la microscopie optique ou de fluorescence, la fluorimétrie, la luminométrie et la spectrométrie.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit agent biologique est sélectionné dans le groupe constitué par les virus, les vecteurs de transfert de gènes viraux et non-viraux, les vaccins, les anticorps et les protéines recombinantes.

5 La présente invention a également pour objet un kit ou une trousse de dosage (titrage) ou de détection d'un agent biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des cellules cibles vivantes à une concentration D constante,
- un agent biologique de référence de concentration C connue,
- 10 - la courbe de référence dudit agent biologique $t_{\beta} = f(C)$.

Une telle trousse de dosage doit être associée, pour mesurer l'intensité du signal de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, à un moyen physique approprié.

Cette trousse de dosage qui permet des mesures en temps réel, est
15 particulièrement adaptée, notamment à la détermination du titre (titrage) d'un vecteur utilisé en thérapie génique, d'un virus utilisé pour la production d'un vaccin, d'une protéine recombinante utilisée pour la production d'un produit biologique (médicament, réactif) ou bien au dosage et/ou à la détection d'un virus, pour le diagnostic d'une infection virale.

20 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente les valeurs expérimentales de l'intensité
25 du signal de fluorescence i , en fonction du temps t pour chaque concentration (conc.) d'un vecteur rétroviral codant la protéine fluorescente (EGFP). Les concentrations sont exprimées pour 10^6 particules infectieuses /ml.

- la figure 2 représente les courbes $i = f(t)$, déterminées à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 1.

- 30 - la figure 3 représente les valeurs t_{β} pour les différentes concentrations de vecteur, déterminées à partir de la courbe de la figure 2, pour la valeur $\beta = 100$ de i .

- la figure 4 représente la courbe de référence du vecteur rétro-viral $t_{\beta} = f(C)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 3.
- la figure 5 représente les valeurs expérimentales de l'intensité du signal d'hybridation i , en fonction du temps t , pour chaque dilution d'un vecteur
5 associé à l'adénovirus recombinant (AAVr).
- la figure 6 représente les courbes $i = f(t)$, déterminées à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 5.
- la figure 7 représente les valeurs t_{β} pour les différentes concen-trations de vecteur, déterminées à partir de la courbe de la figure 6, pour la valeur $\beta =$
10 -2 de i .
- la figure 8 représente la courbe de référence du vecteur AAVr, $t_{\beta} = f(C)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 7.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en
15 aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Détermination du titre d'un vecteur rétroviral dans des cellules Rat-2.

1.1-Matériels et méthodes

L'agent biologique analysé est un vecteur rétroviral dénommé pSI-
20 EGFP (Ropp et al., Cytometry, 1995, 21, 309-317), codant le gène rapporteur de la protéine fluorescente eucaryote (*Eukaryotic Green Fluorescent Protein* ou EGFP), les cellules cibles sont les cellules Rat-2 (ATCC CRL1764) et la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes est l'expression du gène rapporteur EGFP. Le produit P qui est mesuré pour déterminer le titre dudit vecteur (concentration en parti-
25 cules rétrovirales infectieuses ou ip) est la quantité de protéine EGFP, qui est mesurée par fluorimétrie.

Des cellules Rat-2 sontensemencées dans les puits d'une plaque de microtitration à une concentration constante, puis infectées à $t = 0$, avec les dilutions 1/2, 1/4 et 1/10 d'une préparation de vecteur rétroviral de référence de concentration
30 initiale connue ($C_0 = 10^6$ particules infectieuses /ml), correspondant respectivement aux concentrations de $0,5.10^6$; $0,25.10^6$ et $0,1.10^6$ particules infectieuses/ml. Aux différents instants $t = 16$ h, 24 h, 40 h, 48 h et 64 h, l'intensité du signal de fluores-

cence i , émis par les cellules infectées par chaque dilution de vecteur est mesurée par fluorimétrie. La courbe $i = f(t)$ est ensuite tracée pour chaque dilution et la valeur β est fixée à 100. Les valeurs t_β , correspondant aux valeurs de t lorsque $i = 100$, sont déterminées pour chaque concentration d'échantillon de référence, puis, la courbe $t_\beta = f(C)$ est tracée à partir de ces valeurs.

1.2-Résultats

La figure 2 représente la courbe $i = f(t)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 1. La figure 4 représente la courbe de référence du vecteur rétroviral, $t_\beta = f(C)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 3.

La figure 2 montre que l'intensité du signal est une fonction du temps t d'incubation du vecteur avec les cellules cibles et de la concentration C dudit vecteur.

La figure 2 montre également que la valeur $\beta=100$, permet une détermination sensible et précise de la concentration du vecteur car elle détecte de faibles concentrations de vecteur et pour cette valeur, les variations de C correspondent à une variation importante de t . Ces résultats sont confirmés par la figure 4 qui représente la courbe de référence du vecteur, $t_\beta = f(C)$. Cette courbe de référence montre qu'il existe une relation directe entre la valeur de t_β et de C qui permet de déterminer la concentration d'une préparation de vecteur, sans dilution et sans manipulation des cellules, simplement par détermination de la valeur expérimentale t_β de ce vecteur, correspondant à la valeur de $\beta = 100$.

EXEMPLE 2 : Comparaison du titre d'un vecteur associé à l'adénovirus recombinant (AAVr) déterminé à l'aide des paramètres d'un procédé classique (temps constant et concentration variable) ou du procédé de l'invention (temps variable et concentration constante).

2.1-Matériels et méthodes

L'agent biologique analysé est un virus associé à l'adénovirus, recombinant (AAVr), codant le gène rapporteur lacZ, les cellules cibles sont la lignée Hela-repcap32, la réaction agent biologique + cellules cible vivantes est la réplication virale et le produit P qui est mesuré pour déterminer le titre du vecteur (concentration

en particules actives ou ip) est le nombre de copies de génome de AAVr. P est mesuré par hybridation de type Dot-blot selon les techniques classiques connues de l'Homme du métier.

Les cellules Hela-repcap32 sontensemencées dans les puits d'une
5 plaque de microtitration à une concentration constante, puis co-infectées, à $t = 0$, avec les dilutions 10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9} du vecteur et l'adénovirus sauvage, à une multiplicité d'infection de 100.

Aux différents instants $t = 6$ h, 14 h, 18 h, 20 h, 24 h, 30 h, 38 h, 44 h, 48 h et 54 h, les cellules sont récoltées puis le génome viral est isolé et hybridé avec
10 une sonde nucléotidique spécifique marquée, selon la technique du Dot Blot classiquement utilisée par l'homme du métier. L'intensité du signal, qui représente la quantité d'ADN hybridée est mesurée à l'aide d'un phosphorimageur.

Pour la détermination du titre par le procédé classique, la courbe $\log i = f(\log \text{dilution})$ est tracée à partir des valeurs obtenues au temps $t = 24$ h et le titre
15 est déterminé par approximation asymptotique dans la région des plus fortes dilutions.

Pour la détermination du titre par le procédé de l'invention, la courbe $\log i = f(t)$ est tracée pour chaque dilution de vecteur et la valeur β est fixée à -2. Les valeurs t_β , correspondant aux valeurs de t lorsque $i = -2$, sont déterminées pour chaque concentration de l'agent de référence, puis, la courbe $t_\beta = f(\log C)$ est tracée à
20 partir de ces valeurs.

2.2-Résultats

La figure 6 représente la courbe $\log i = f(t)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 5. La figure 8 représente la courbe de référence du vecteur AAVr, $t_\beta = f(\log C)$, déterminée à partir des valeurs expéri-
25 mentales présentées à la figure 7.

La figure 6 montre que l'intensité du signal est une fonction du temps t d'incubation du vecteur avec les cellules cibles et de la concentration C dudit vecteur.

La figure 6 montre également que la valeur $\beta = -2$, permet une détermination sensible et précise de la concentration du vecteur, car elle détecte de faibles concentrations de vecteur et pour cette valeur, les variations de C correspondent à une variation importante de t .
30

Ces résultats sont confirmés par la figure 8 qui représente la courbe de référence du vecteur, $t_{\beta} = f(\log C)$. Cette courbe de référence montre qu'il existe une relation directe entre les valeurs de t_{β} et de C qui permet de déterminer, avec précision et sans dilution, la concentration d'une préparation de vecteur, à partir d'une
5 seule valeur expérimentale t_{β} de ce vecteur correspondant à la valeur de $\beta = -2$.

A titre comparatif, pour une même préparation de vecteur, le procédé classique donne un titre de 1×10^8 particules infectieuses/ml et le procédé de l'invention donne un titre de $0,85 \times 10^8$ particules infectieuses/ml. Ces résultats montrent que les valeurs obtenues par le procédé de l'invention sont comparables à
10 celles obtenus par les procédés classiques de titrage d'agents biologiques.

Néanmoins, contrairement aux procédés classique le procédé de détermination du titre d'agent biologiques de l'invention permet avantageusement d'analyser de nombreux échantillons, simultanément et en temps réel. En effet, il est simple, rapide, précis, standardisé, automatisable et la valeur de l'intensité du signal
15 qui mesure le produit de la réaction de l'agent biologique avec les cellules cibles vivantes est obtenue instantanément, sans intervention sur les cellules cibles et sur la réaction biologique dont le produit est mesuré.

Ainsi, le procédé de l'invention est utilisable aussi bien pour :

- cribler rapidement une banque de vecteurs de transfert de gènes
20 ou de mutants d'une protéine recombinante,
- optimiser ou contrôler la production : des vecteurs de transfert de gènes thérapeutiques utilisables pour des essais précliniques et des essais cliniques de phase I, des virus utilisés comme vaccins viraux ou des protéines recombinantes utilisées comme médicament ou comme réactif biologique et
25
- détecter rapidement une infection virale à partir d'un échantillon biologique d'un patient à tester.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les
30 variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Procédé de détermination du titre d'un agent biologique interagissant avec des cellules cibles vivantes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- 5 (a₁) l'incubation dudit agent biologique à une concentration C initiale inconnue, avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,
- (b₁) la mesure à différents temps successifs t , de l'intensité i d'un même signal, qui résulte de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes,
- (c₁) la détermination du temps t_β correspondant à la valeur $i = \beta$,
- 10 choisie dans l'intervalle $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$, tel que β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement les concentrations minimales et maximales d'un agent biologique de référence dont la courbe $t_\beta = f(C)$ est préétablie et
- (d₁) la détermination de la concentration C initiale de l'agent biologique, à l'aide de ladite courbe de référence $t_\beta = f(C)$.
- 15

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que simultanément ou préalablement à l'étape (a₁), ladite courbe de référence est établie selon les étapes suivantes :

- (a₀) la préparation, de n dilutions en série d'un agent biologique de
- 20 référence de concentration C_0 initiale connue, correspondant respectivement aux concentrations finales C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique,
- (b₀) l'incubation de chaque dilution dudit agent biologique de référence obtenue en (a₀) avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,
- (c₀) la détermination à différents temps successifs t_1 à t_n de
- 25 l'intensité du signal i qui résulte de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, pour chaque concentration C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique de référence,
- (d₀) le tracé de la courbe $i = f(t)$ pour chaque valeur C_1, C_2, \dots, C_n ,
- (e₀) la détermination de la valeur β de i , telle que $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$ et
- 30 β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement C_n et C_1 ,
- (f₀) le tracé de la courbe de référence $t_\beta = f(C)$ pour la valeur $i = \beta$

3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que ledit agent biologique est sélectionné dans le groupe constitué par les virus, les vecteurs de transfert de gènes viraux et non-viraux, les vaccins, les anticorps et les protéines recombinantes.

5 4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit signal est sélectionné dans le groupe constitué par la fluorescence, la luminescence, l'absorbance et le dénombrement de cellules.

5°) Trousse de dosage ou de détection d'un agent biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 10
- des cellules cibles vivantes à une concentration D constante,
 - un agent biologique de référence de concentration C connue, et
 - la courbe de référence dudit agent biologique $t_{\beta} = f(C)$.

Figure 1

conc.	temps (h)				
	16	24	40	48	64
0.1	20,4	30,1	95,1	138,7	157,3
0.25	26,8	48,5	173,3	228,2	191,7
0.5	38,1	72	198,7	296,2	203,7

Figure 2

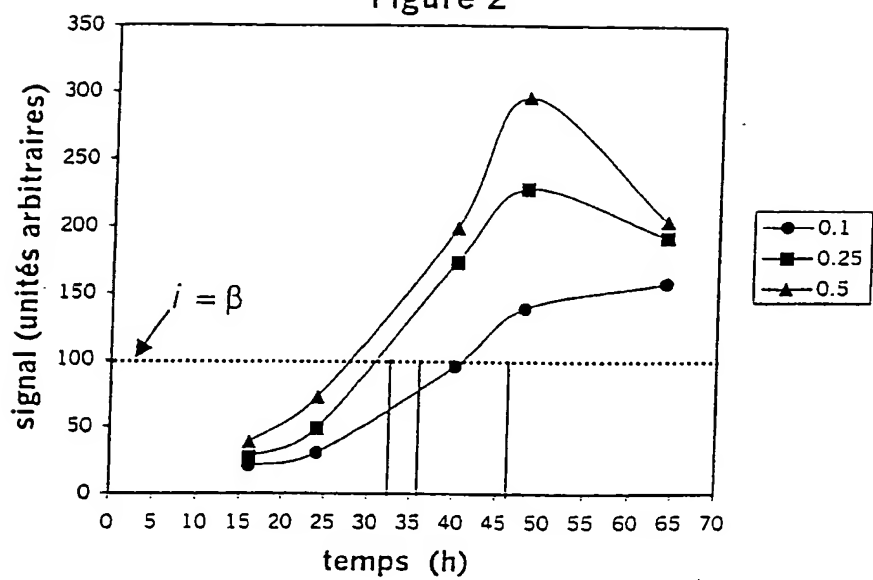


Figure 3

conc.	0,1	0,25	0,5
t_{β} (h)	42	31	28

Figure 4

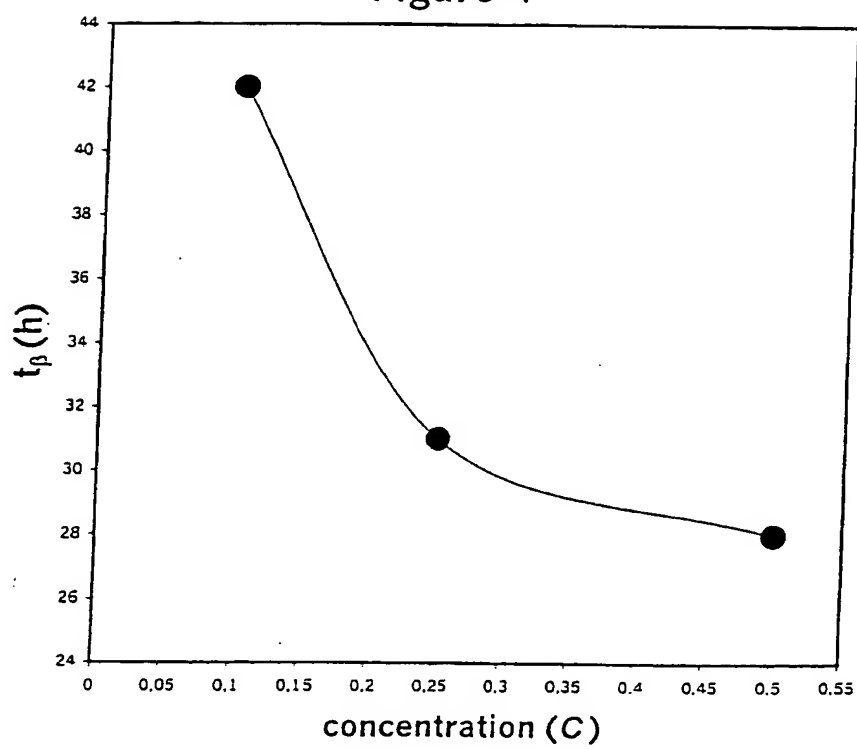


Figure 5

conc.	temps (h)									
	6	14	18	20	24	30	38	44	48	54
10exp-4	-1,62	-1,81	-2,41	-2,61	-2,85	-3,38	-3,61	-4,01	-3,89	-3,67
10exp-7	-1,37	-1,33	-1,61	-1,73	-2,05	-2,67	-2,96	-3,23	-3,29	-3,17
10exp-8	-1,29	-1,32	-1,41	-1,36	-1,59	-1,96	-2,32	-2,58	-2,81	-2,46
10exp-9	-1,31	-1,32	-1,41	-1,38	-1,48	-1,65	-2,02	-2,22	-2,45	-2,19

6/8

Figure 6

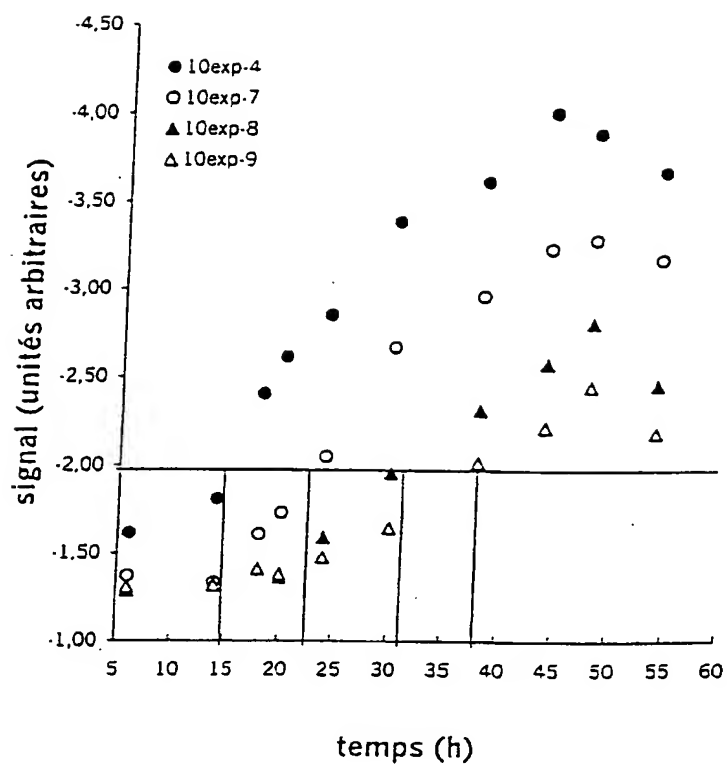
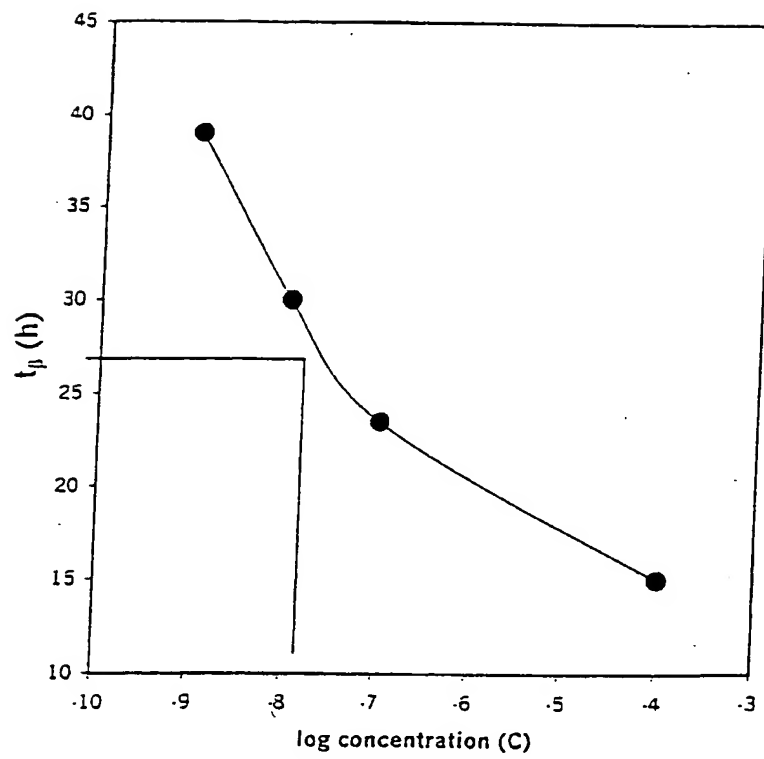


Figure 7

Conc (log)	t_p (h)
-4	15
-7	23,5
-8	30
-9	39

Figure 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 01/01366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/50 C12Q1/68 C12N7/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHARBORD P; NEEL H; LEHN P; PARMENTIER C: "NORMAL HUMAN GRANULO MONOCYTIC BONE MARROW PROGENITOR CELLS RESPONSIVENESS TO COLONY STIMULATING ACTIVITY" NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol. 22, 1980, pages 357-370, XP000949859 page 363; figure 3	1-5
A	SCHUHMANN KLAUS; ROMANIN CHRISTOPH; BAUMGARTNER WERNER; GROSCHNER KLAUS: "Intracellular Ca ²⁺ inhibits smooth muscle L-type Ca ²⁺ channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel" JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, vol. 110, November 1997 (1997-11), pages 503-513, XP000949861 abstract	1-5
--- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
3 September 2001	12/09/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Griffith, G	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/01366

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MOULLIER P; DAVELOOSE D; LETERRIER F; HOEBEKE J: "COMPARATIVE BINDING OF WHEAT GERM AGGLUTININ AND ITS SUCCINYLATED FORM ON LYMPHOCYTES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 161, 1986, pages 197-204, XP000951462 page 199; figure 4</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-5
A	<p>DAVIS A R ET AL: "HIGH THROUGHPUT METHOD FOR CREATING AND SCREENING RECOMBINANT ADENOVIRUSES" GENE THERAPY, GB, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, vol. 5, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 1148-1152, XP000867556 ISSN: 0969-7128 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-5
A	<p>WO 99 11764 A (TARGETED GENETICS CORPORATION) 11 March 1999 (1999-03-11) cited in the application example 4</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-5
A	<p>ATKINSON E M ET AL: "A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 26, no. 11, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 2821-2823, XP002099502 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-5
A	<p>NELSON DAVID M; WAHLFORS J JARMO; CHEN LIN; ONODERA MASAFUMI; MORGAN RICHARD A: "Characterization of diverse viral vector preparations, using a simple and rapid whole-virion dot-blot method" HUMAN GENE THERAPY, vol. 9, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 2401-2405, XP000951429 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-5
A	<p>MITTEREDER NANETTE; MARCH KEITH L; TRAPNELL BRUCE C: "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 11, November 1996 (1996-11), pages 7498-7509, XP002148995 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-5
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01366

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production"</p> <p>HUMAN GENE THERAPY, XX, XX, vol. 9, no. 5, 20 March 1998 (1998-03-20), pages 695-706, XP000946374</p> <p>ISSN: 1043-0342</p> <p>cited in the application</p> <p>page 697, column 2, paragraph 2 -page 699, column 1, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/01366

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9911764 A	11-03-1999	AU 9306098 A EP 1009808 A	22-03-1999 21-06-2000

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/50 C12Q1/68 C12N7/02		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHARBORD P; NEEL H; LEHN P; PARMENTIER C: "NORMAL HUMAN GRANULO MONOCYTIC BONE MARROW PROGENITOR CELLS RESPONSIVENESS TO COLONY STIMULATING ACTIVITY" NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol. 22, 1980, pages 357-370, XP000949859 page 363; figure 3	1-5
A	SCHUHMAN KLAUS; ROMANIN CHRISTOPH; BAUMGARTNER WERNER; GROSCHNER KLAUS: "Intracellular Ca ²⁺ inhibits smooth muscle L-type Ca ²⁺ channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel" JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, vol. 110, novembre 1997 (1997-11), pages 503-513, XP000949861 abrégé	1-5
--- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe	
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent		
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date		
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)		
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens		
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention		
X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément		
Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier		
Z document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 3 septembre 2001		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 12/09/2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Griffith, G

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MOULLIER P; DAVELOOSE D; LETERRIER F; HOEBEKE J: "COMPARATIVE BINDING OF WHEAT GERM AGGLUTININ AND ITS SUCCINYLATED FORM ON LYMPHOCYTES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 161, 1986, pages 197-204, XP000951462 page 199; figure 4</p> <p>---</p>	1-5
A	<p>DAVIS A R ET AL: "HIGH THROUGHPUT METHOD FOR CREATING AND SCREENING RECOMBINANT ADENOVIRUSES" GENE THERAPY, GB, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, vol. 5, no. 8, août 1998 (1998-08), pages 1148-1152, XP000867556 ISSN: 0969-7128 le document en entier</p> <p>---</p>	1-5
A	<p>WO 99 11764 A (TARGETED GENETICS CORPORATION) 11 mars 1999 (1999-03-11) cité dans la demande exemple 4</p> <p>---</p>	1-5
A	<p>ATKINSON E M ET AL: "A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 26, no. 11, 1 juin 1998 (1998-06-01), pages 2821-2823, XP002099502 ISSN: 0305-1048 cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	1-5
A	<p>NELSON DAVID M; WAHLFORS J JARMO; CHEN LIN; ONODERA MASAFUMI; MORGAN RICHARD A: "Characterization of diverse viral vector preparations, using a simple and rapid whole-virion dot-blot method" HUMAN GENE THERAPY, vol. 9, 1 novembre 1998 (1998-11-01), pages 2401-2405, XP000951429 cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	1-5
A	<p>MITTEREDER NANETTE; MARCH KEITH L; TRAPNELL BRUCE C: "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 11, novembre 1996 (1996-11), pages 7498-7509, XP002148995 cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	1-5

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production" HUMAN GENE THERAPY, XX, XX, vol. 9, no. 5, 20 mars 1998 (1998-03-20), pages 695-706, XP000946374 ISSN: 1043-0342 cité dans la demande page 697, colonne 2, alinéa 2 -page 699, colonne 1, alinéa 1</p>	1-5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

internationale No

PCT/FR 01/01366

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9911764 A	11-03-1999	AU 9306098 A EP 1009808 A	22-03-1999 21-06-2000